TR021YS-0124

ダイオネクス テクニカル リビュー

TECHNICAL REVIEW

200408
200409R
200610R

イオンクロマトグラフ Q&A その 7
グラジエント溶出法

【はじめに】

近年分離能の高いイオン交換カラムが多く市販され、一定濃度の溶離液を用いる条件（イソクラティック溶出法）でもさまざまな試料に対応できるようになりました。しかし、フッ化物イオンと酢酸、ギ酸などの溶出の早い成分を分離したうえで、さらに溶出の遅い硫酸などの成分と同時測定する場合や、高濃度の夾雑物を含む試料中の微量イオンの測定のように、イソクラティック溶出法では対応できないアプリケーションもあります。このような場合は、グラジエント溶出法が効果的です。グラジエント溶出法は、溶出力を徐々に高めていく手法のことで、一般には一分析時間内に溶離液の濃度を上げたり（濃度グラジエント）、数種の溶離液の比率を変えていくこと（組成グラジエント）をいいます。グラジエントをおこなうことによって、測定イオンの分離を調整でき、かつ溶出の遅いイオンのピーク形状をシャープにすることが可能です。

この技術資料では、サプレッサ式イオンクロマトグラフィーにおける濃度グラジエントについて説明します。

【グラジエント溶出法に用いる溶離液】

グラジエント用の溶離液としては、陰イオン分析における水酸化物系溶離液（水酸化カリウムまたは水酸化ナトリウム）や陽イオン分析におけるメタンスルホン酸などのように、サプレスト（サプレッサによって溶離液の電気伝導度を低下すること）後の電気伝導度が低いものが適しています。たとえば、炭酸ナトリウム溶液を溶離液に用いた場合、サプレスト後の電気伝導度は 15～25 µS/cm で、溶離液濃度を上げると顕著なベースラインのシフトが見られます（図 1-A）。これに対し、水酸化ナトリウム溶液などの水酸化物系溶離液はサプレストされることでほぼ水になるため、電気伝導度は 1 µS/cm 以下になります。このため、溶離液濃度を上げたことによる電気伝導度の増加、つまりベースラインシフトはほとんどありません（図 1-B）。ベースラインシフトが大きいと微量イオンの測定が困難であるため、サプレスト後に水になってベースラインシフトがほとんど起こらない溶離液がグラジエント分析には適しています。

なお、グラジエント分析をおこなうためには、溶離液ジェネレータかグラジエントポンプが必要です。

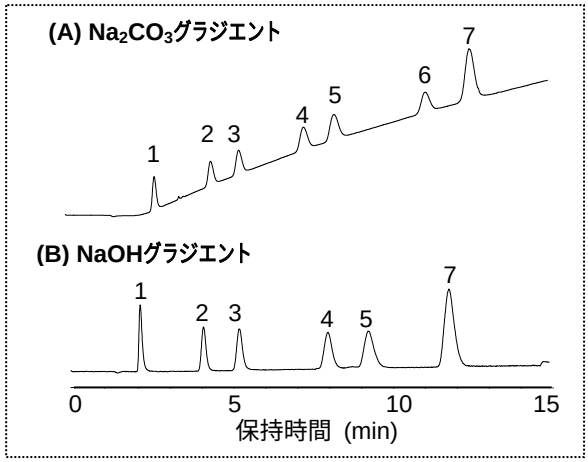

図 1　炭酸系溶離液と水酸化物系溶離液 グラジエント時のベースラインの違い

分析条件；カラム: IonPac AG12A/ AS12A
カラム温度: 35℃
溶離液: (A) Na_2CO_3, 1～8 mmol/L (0～20 min)
(B) NaOH, 50～100 mmol/L (0～20 min)
溶離液流量: 1.5 mL/min
検出: 電気伝導度（サプレッサ使用）
ピーク；1.F^-, 2.Cl^-, 3.NO_2^-, 4.Br^-, 5.NO_3^-, 6.PO_4^{3-}, 7. SO_4^{2-}

【グラジエント溶出法の利点】

グラジエント溶出法の最も大きな利点は、分離を容易に改善できる点です。図 2 に、同一試料を一定濃度の溶離液（イソクラティック溶出法）とグラジエント溶出法で測定したクロマトグラムを示します。グラジエント溶出法では、塩化物イオンと亜硝酸イオンを分離した後、溶離液濃度を上げて硫酸イオンを溶出しています。硫酸イオンは 2 つのクロマトグラムで同じくらいの時間に溶出していますが、グラジエントをおこなった場合の方がシャープなピークです。これは、グラジエントの最終濃度がイソクラティックの濃度よりも高いためです。つまり、グラジエントによって分離を改善できるだけでなく、溶出の遅いイオンのピーク感度を向上することもできます。

グラジエントによってピーク幅をより小さくできる理由は、溶離液濃度が低いときは保持の強い成分はほとんどイオン交換されず、ある濃度を超えた時点で一気にイオン交換されて溶出するためと考えられています。

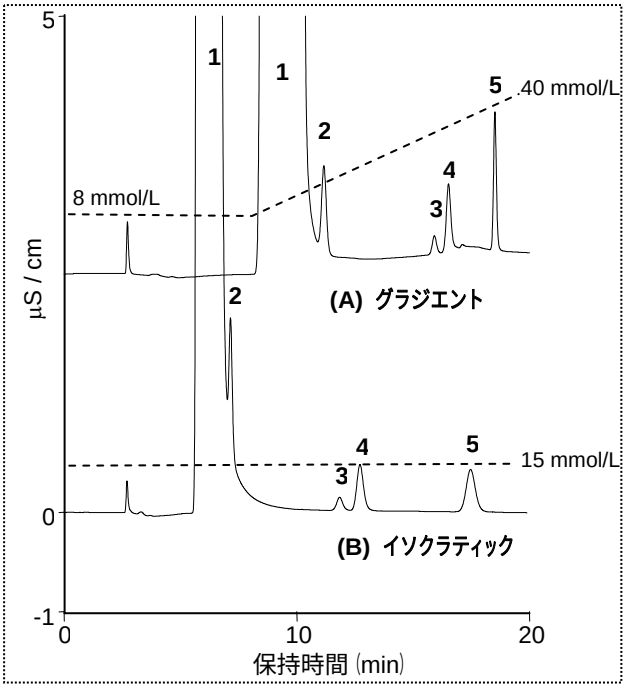

図 2 グラジエント溶出法(A)とイソクラティック溶出法(B)の比較 (図中点線は溶離液濃度の変化を表す)

分析条件; カラム: IonPac AG11-HC/ AS11-HC
カラム温度: 35℃
溶離液: KOH (溶離液ジェネレータ使用)
(A) グラジエント 8 mmol/L (0～8 min)
8～40 mmol/L (8～20 min)
(B) イソクラティック 15 mmol/L
溶離液流量: 1.0 mL/min
検出: 電気伝導度 (サプレッサ使用)
ピーク; 1.Cl^-; 2000 mg/L, 2.NO_2^-; 1 mg/L, 3. CO_3^{2-}, 4. NO_3^-; 1 mg/L, 5. SO_4^{2-}; 1 mg/L

【グラジエントプログラムの違いによる保持時間の変化】

試料夾雑物や測定イオンの種類や濃度、カラムの種類などによって、最適なグラジエントプログラムは異なります。試料やカラムに合ったグラジエントプログラムを作るためには、カラム添付 CD の各カラム取扱説明書中, ラジエントプログラム例を参考にして、部分的な変更を加えるとよいでしょう。図 3 に基本的なグラジエントプログラムを示します。溶離液濃度を時間に対して直線的に高めることをリニアグラジエント(図 3-A)と言います。一部の分離を改善したい場合は、初期濃度に対して、溶離液の濃度変化を大きくし、その後変化を小さくする場合 (図 3-B) や、初期濃度に対してゆっくりと濃度を上げ、最後に急激に高めるような (図 3-C)、カーブドグラジエントが有効です。測定目的イオンの分離が終わった後、溶出の遅いイオンを早く溶出させるには、溶離液濃度を切り替えるようなステップグラジエント (図 3-D) が有効です。初期濃度と最終濃度が同じリニア、カーブド、ステップグラジエント例を図 4 に示します。グラジエントのプロファイルが異なるだけで、保持時間が大きく変化することがわかります。

なお、グラジエントプログラムを作成する際には、測定の後または直前に、初期濃度の溶離液を 5～10 分流すような設定 (再平衡化) をおこないます。

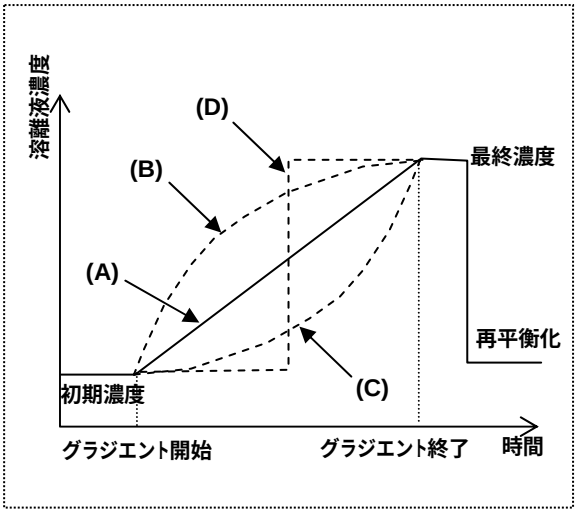

図 3 基本的なグラジエントプログラム
(A) リニアグラジエント、(B) 上に凸のカーブドグラジエント、(C) 下に凸のカーブドグラジエント、(D) ステップグラジエント

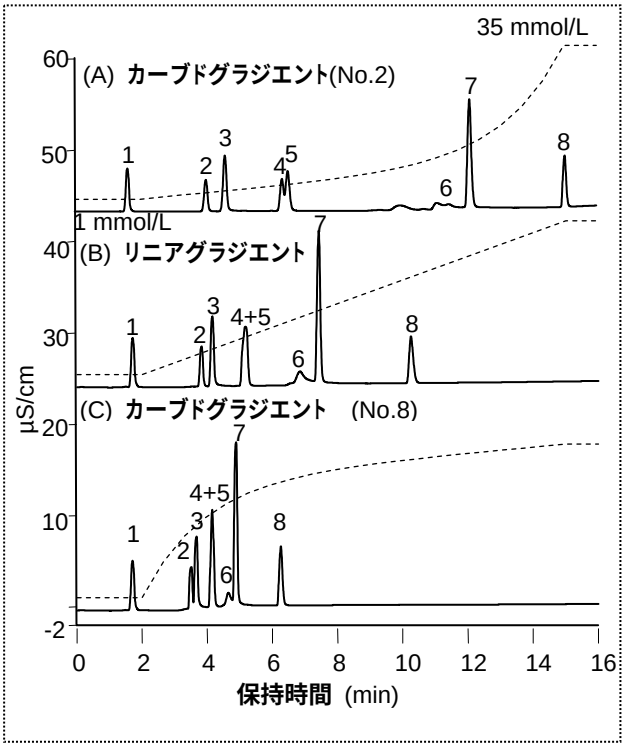

図 4 グラジエントプログラムによる保持時間の違い
(図中の点線は溶離液濃度の変化を、括弧内 No はグラジエントカーブ番号を表す)

分析条件; カラム: IonPac AG11/ AS11
カラム温度: 35 ℃
溶離液: KOH (溶離液ジェネレータ使用)
グラジエント初期濃度: 1 mmol/L (0～2 min)
グラジエント最終濃度: 35 mmol/L (15 min)
(A) カーブドグラジエント (カーブ No.2)
(B) リニアグラジエント
(C) カーブドグラジエント (カーブN0.8)
溶離液流量: 1.0 mL/min
検出: 電気伝導度 (サプレッサ使用)
ピーク; 1.F^-, 2.Cl^-, 3.NO_2^-, 4.Br^-, 5.NO_3^-, 6.CO_3^{2-}, 7.SO_4^{2-}, 8.PO_4^{3-}

一方、グラジエントの初期濃度を一定にして最終濃度だけを変えると、溶出の早いイオンの保持時間はほとんど変化せず、溶出の遅いイオンの保持時間が大きく変化します。図 5 には、グラジエントの初期濃度を 5 mmol/L とし、最終濃度を 45 から 65 mmol/L まで直線的に（グラジエントカーブ番号 5 番で）変化したときのクロマトグラムを示します。図 4 のグラジエントカーブを変えたときと異なり、硫酸イオンやリン酸イオンのような溶出の遅いイオンの保持時間だけが大きく変化していることがわかります。

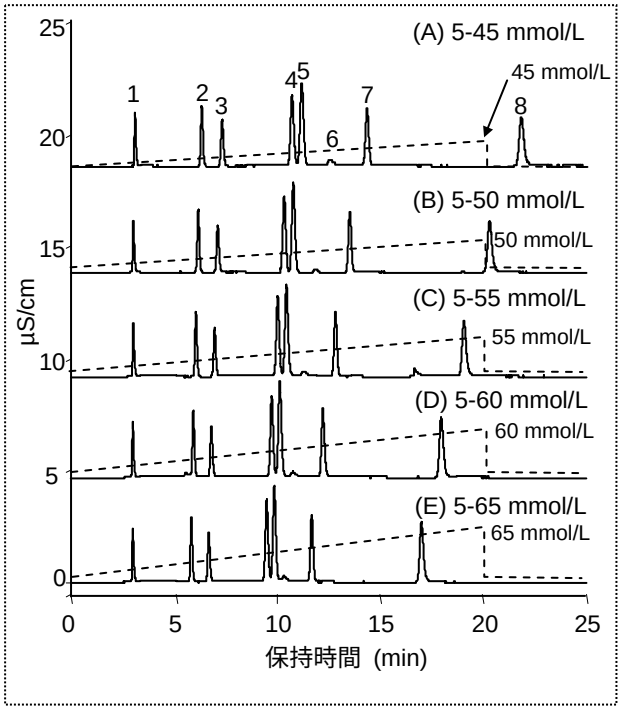

図 5 グラジエント最終濃度の違いによる保持時間の違い
（図中の点線は溶離液濃度の変化を表す）

分析条件；カラム: IonPac AG11-HC/ AS11-HC
カラム温度: 35℃
溶離液: KOH（溶離液ジェネレータ使用）
グラジエント初期濃度: 5 mmol/L, 20 min のときのグラジエント最終濃度: (A) 45 mmol/L, (B) 50 mmol/L, (C) 55 mmol/L, (D) 60 mmol/L, (E) 65 mmol/L
溶離液流量: 1.0 mL/min
検出: 電気伝導度（サプレッサ使用）
ピーク； 1. F^-, 2. Cl^-, 3.NO_2^-, 4.Br^-, 5.NO_3^-, 6.CO_3^{2-}, 7.SO_4^{2-}, 8.PO_4^{3-}

【陽イオンのグラジエント分析】

アルカリ金属とアルカリ土類金属、アンモニウムイオンはイソクラティックで分離できますが、アルコールアミンやアルキルアミン類との一斉測定にはグラジエントは非常に有効です。図 6 にはカラム IonPac CS17 を用いた陽イオン類のイソクラティックとグラジエント分析例の比較を示します。各イオンの濃度が小さい場合はイソクラティックでも分離可能ですが、とくにアルカリ金属類とアンモニウムイオンの濃度差がある場合は、グラジエントによって分離を改善し、なおかつアルカリ土類金属のピークを感度良く溶出することができます。

なお、陽イオン分析においてサプレッサ式イオンクロマトグラフィーの一般的な溶離液であるメタンスルホン酸は、イソクラティックだけでなくグラジエント分析にも適しています。

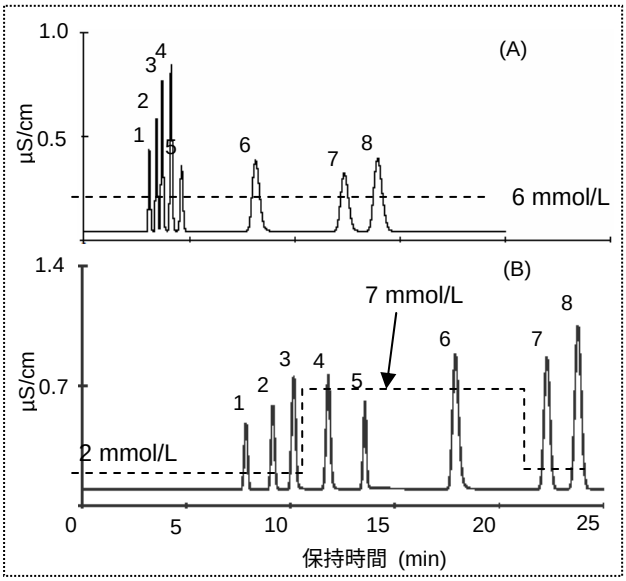

図 6 陽イオンのイソクラティック分析とグラジエン分析の比較
（図中の点線は溶離液濃度の変化を表す）

分析条件； カラム: IonPac CG17/ CS17
カラム温度: 30℃
溶離液: メタンスルホン酸（溶離液ジェネレータ使用）
(A) 6 mmol/L
(B) 2 mmol/L (0～11 min); 7 mmol/L (11～22 min); 2 mmol/L (22～25 min)
溶離液流量: 1.0 mL/min
検出: 電気伝導度（サプレッサ使用）
ピーク； 1.Li^+, 2.Na^+, 3.NH_4^+, 4.K^+, 5.ジメチルアミン, 6.トリメチルアミン, 7.Mg^{2+}, 8.Ca^{2+}

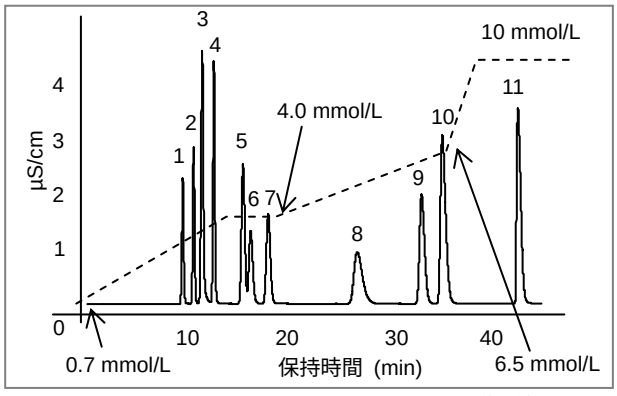

図7 IonPac CS17カラムを用いたグラジエント分析例
（図中の点線は溶離液濃度の変化を表す）

分析条件； カラム: IonPac CG17/ CS17
カラム温度: 30℃
溶離液: メタンスルホン酸（溶離液ジェネレータ使用）
0.7～4.0 mmol/L (0～15 min); 4.0 mmol/L (15～20 min); 4.0～6.5 mmol/L (20～37 min), 6.5～10 mmol/L (37～40 min)
溶離液流量: 1.0 mL/min
検出: 電気伝導度（サプレッサ使用）
ピーク； 1. Li^+, 2.Na^+, 3.NH_4^+, 4.K^+, 5.ジメチルエタノールアミン, 6.モルホリン, 7.ジエチルエタノールアミン, 8.シクロヘキシルアミン, 9.Mg^{2+}, 10.Ca^{2+}, 11.エチレンジアミン

【グラジエント分析対応カラム】

基本的にはどのようなイオン交換カラムを用いてもグラジエント分析は可能ですが、イソクラティック条件で分離が最適化されているカラムと、グラジエント条件で分離が最適化されているカラムがあります。

表 1 グラジエント分析対応陰イオン交換カラム

カラム名称	特　長
IonPac AS11	グラジエントによる無機陰イオンと有機酸イオンの分析およびポリリン酸の分析
IonPac AS11-HC	グラジエントによる無機陰イオン、有機酸イオンの分析
IonPac AS16*	硫酸イオン以降に溶出する保持の強い成分の分析
IonPac AS17*	無機陰イオン迅速分析
IonPac AS18*	フッ化物イオンと酢酸、ギ酸の分離および臭素酸、塩素酸の同時分析
IonPac AS19*	フッ化物イオンと酢酸、ギ酸の分離および臭素酸を含むハロゲン酸化物の分析
IonPac AS20*	無機陰イオンと有機酸さらに過塩素酸など保持の強い成分のグラジエント分析

*イソクラティック条件でも使用できます。

表 2　グラジエント分析対応陽イオン交換カラム

カラム名称	特　長
IonPac CS12A*	アルカリ金属、アルカリ土類金属の同時分析
IonPac CS14*	アルカリ金属、アルカリ土類金属類の迅速分析
IonPac CS16*	アルカリ金属、アルカリ土類金属、ナトリウムとアンモニウムイオン、アミン類の分離
IonPac CS17*	アミン類の分離、比較的分子量の大きいアミン類の分析

*イソクラティック条件でも使用できます。

【おわりに】

試料によってはイソクラティック条件では十分な分離が得られないことがあり、そのような場合はグラジエント溶出法が有効です。グラジエント溶出法を用いることにより多成分を一斉に分離できるだけでなく、ピークが広がりがちな溶出の遅い成分のピーク形状を良好にし、高感度で測定することが可能となります。

日本ダイオネクス株式会社
URL http://www.dionex.co.jp

□本　　社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-3-14 DNX新大阪ビル
TEL(06)6885-1213 FAX(06)6885-1215
□東京支社 〒116-0014 東京都荒川区東日暮里5-17-9 イマス日暮里ビル
TEL(03)5850-6080 FAX(03)5850-6085
□名古屋営業所 〒450-0002 名古屋市中村区名駅3-16-3 名駅アイサンビル
TEL(052)571-8581 FAX(052)571-8582
□大阪営業部 〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-3-14 DNX新大阪ビル
TEL(06)6885-1335 FAX(06)6885-1215
□九州営業所 〒812-0038 福岡市博多区祇園町1-28 シグマ博多ビル
TEL(092)271-4436 FAX(092)262-0737

電子署名者 : Jun Kato
DN: CN = Jun Kato, C = JP, L = Yodogawa-ku Osaka-city, S = Osaka, O = Nippon Dionex k.k.
理由 : この文書の承認者
場所 : 大阪市淀川区西中島6-3-14
日付 : 2007.08.25 12:23:29 +09'00'